

3.1. Redox potential of T1 copper site of *F. proliferatum* laccase

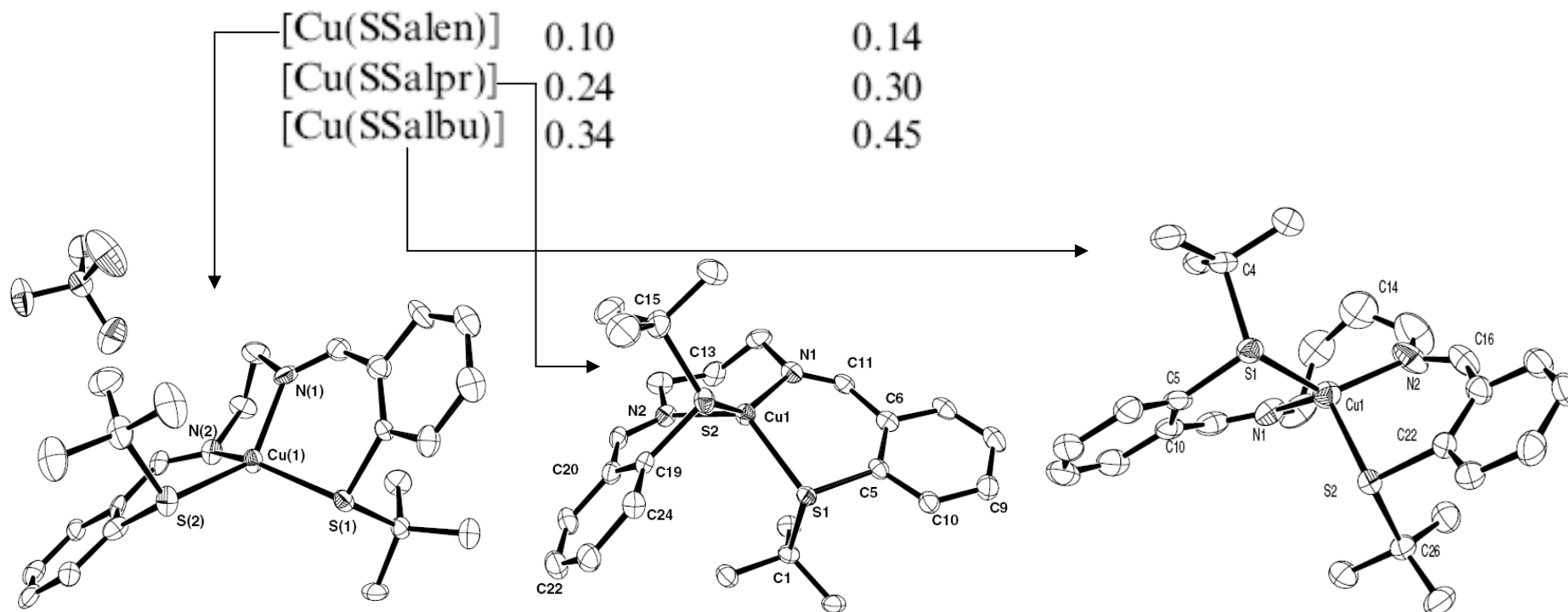
The redox potential of the $\text{K}_3\text{Mo}(\text{CN})_8/\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ couple was determined from CVs (data not shown) showing a E^0 of 525 mV vs. SCE (770 mV vs. NHE). This corresponds well with those previously reported [42,45]. The E^0 of the laccase T1 copper site was determined by measuring the disappearance of the absorbance over 450–800 nm due to the addition of $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$, which resulted in T1 copper reduction. The presence of the $\text{K}_3\text{Mo}(\text{CN})_8/\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ couple did not interfere with the T1 absorbance band. The mixing of a small aliquot of $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ stock solution with 18.7 U mg^{-1} *F. proliferatum* laccase and 10 mM $\text{K}_3\text{Mo}(\text{CN})_8$, under anaerobic conditions, caused a proportional decrease in the absorbance band corresponding to the T1 copper site (Fig. 1). The Nernst plot (Fig. 1, insert) shows the dependence of the calculated potential vs. $\log (A/A_0 - A)$. The redox potential of *F. proliferatum* laccase estimated from the titration curve was found to be 510 mV vs. SCE (750 mV vs. NHE), which allows this enzyme to be included in the high redox potential laccases group [22]. This E^0 value was similar to that determined for *T. versicolor* laccase (535 mV vs. SCE) under the same assay conditions, used as control.

Характеристика редокс-свойств лакказы, перспективной для использования в биосенсорах и биотопливных элементах. Записать все равновесия, которые реализуются в описанной процедуре «титрования», и соотношения, используемые для определения E^0 .

2

Три комплекса меди(1+) с разными лигандами имитируют активные центры медных («синих») металлопротеинов. Их редокс-потенциалы E^0 определены экспериментально в ферроценовой шкале в растворах на основе MeCN (ацетонитрил) и DCM (дихлорметан), в скобках диэлектрические проницаемости этих растворителей. Оценить вклады энергии сольватации в наблюдаемые различия E^0 и константы устойчивости комплексов.

E^0 (V)	E^0 (V)
MeCN (37.5)	DCM (9.1)
[Cu(SSalen)] 0.10	0.14
[Cu(SSalpr)] 0.24	0.30
[Cu(SSalbu)] 0.34	0.45



Описана следующая процедура приготовления смеси для реализации ферментного биосенсора :

1.0 mg of ZnO nanoparticles was mixed with 250 μL of chitosan (5 wt% in acetic acid). The above mixture was sonicated for 20 min. To this mixture, 20 μL of the choline oxidase (ChOx) stock solution (4 mg/ml in PBS) was added.

Оценить величину pH этой смеси.

По данным электронной микроскопии авторы полагают, что ZnO – стержни диаметром 50 нм. Какое заполнение поверхности стержней ферментом может быть достигнуто при указанном соотношении компонентов?

Сравнить это заполнение с определенным экспериментально заполнением $0.8 \cdot 10^{-9}$ моль/см² гладкой поверхности стеклоуглерода, на которую нанесено 3 μL указанной смеси – сложно, т.к. авторы скрыли от читателя геометрическую поверхность стеклоуглерода. Если предположить, что весь фермент в смеси попал на стержни и, вместе с ними, на стеклоуглерод, и экспериментально определенное заполнение этому соответствует – то какая была геометрическая поверхность?

Разрабатывается хемолюминесцентный сенсор на кокаин. Для этого на пористом силикагеле (истинная поверхность 956 м²/г, объем пор 0.42 см³/г), поверхность которого модифицирована аминогруппами, иммобилизуют чувствительные к кокаину молекулы (cocaine aptamer) по следующей процедуре:

5 mg of the MSN-NH₂ was initially dispersed into 500 μL phosphate-buffered saline (PBS, pH 8.0) containing 2.0 M glucose, and the resulting mixture was then gently shaken on the thermomixer for 16 h at room temperature. During this process, glucose can diffused into the pores of the MSN-NH₂. Following that, 200 μL of cocaine aptamer (100 μM) had been added into the suspension. The mixture was gently stirred for 4 h at 277 K. Owing to the interaction between positively charged MSN and negatively charged DNA, the cocaine aptamer had been attached onto the surface of the MSN-NH₂ and gated the glucose inside.

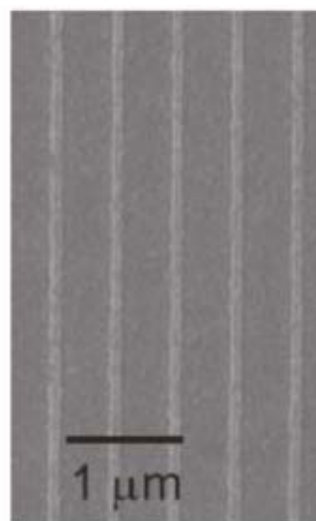
Оценить буферную емкость, необходимую для надежного поддержания постоянства pH в смеси в ходе приготовления.

Определить какой избыток компонентов предусмотрели авторы в описанной процедуре.

5

На каждом биочипе для аналитического применения метода плазмонного резонанса имеется по 4 литографически изготовленных набора параллельных серебряных полос, каждый размером 150x150 мкм. Период 500 нм, ширина полосы 80 нм, высота 3 нм, снаружи нанесен слой оксида алюминия толщиной 4 нм. «Идеология» сенсора такова:

As the imidacloprid has a low molecular weight, we employed an indirect competitive immunoassay to enhance the sensitivity and specificity. The chip surface was first immobilized with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ imidacloprid conjugated with bovine serum albumin proteins (imidacloprid-BSA). Then it was exposed to a mixture of imidacloprid and monoclonal anti-imidacloprid antibodies. The imidacloprid in solution competed with imidacloprid-BSA on chip surface for binding the anti-imidacloprid antibodies. In our experiments, imidacloprid samples with different concentrations were mixed with 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-imidacloprid antibodies for the indirect competitive immunoassay.



0 – 10 ppm

На чип наносили по 0.7 мкл указанных растворов.

Какие при этом достигались соотношения между связанным и свободным имидаклопридом?

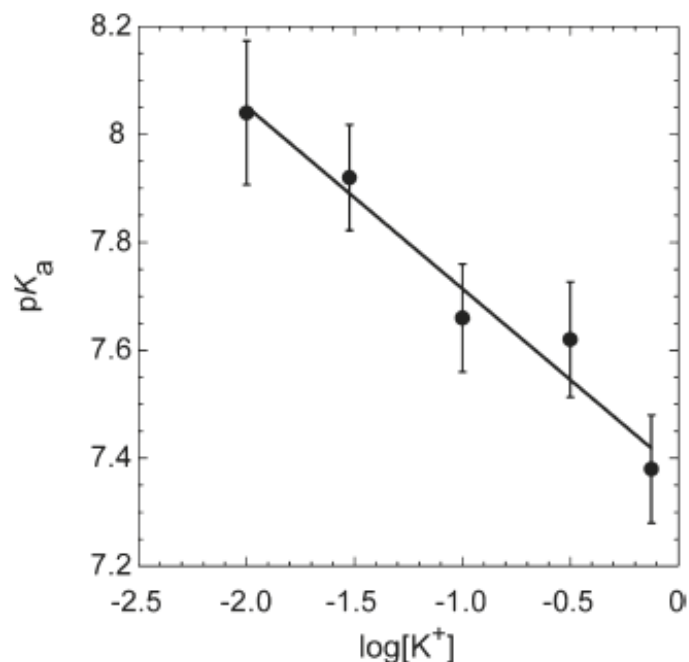
6

Во многих процедурах иммобилизации биологических молекул используется электростатическое связывание, которое управляется равновесиями по протону. Приведены константы кислотности и основности двух аминокислот:

	pK COOH	pK NH ₂
Цистеин C ₃ NH ₂ SH ₇	1.9	10.8
Глицин C ₂ NH ₂ H ₅	2.4	9.8

Определить интервал(ы) pH, в которых возможно селективное электростатическое связывание одной из аминокислот.

Оценить буферную емкость, необходимую для реализации такого селективного связывания при концентрациях обеих аминокислот, равных 0.05 моль/л.



Для электростатического связывания ДНК при иммобилизации существенны равновесия по протону, которые смещаются при изменении ионной силы раствора.

Рассчитать pH, при которых целесообразно проводить иммобилизацию ДНК (исследованной в этой работе), в растворах 0.01 и 0.5 М КСl.

These pK_a values are the average of the values for each phosphorothioate and are listed in Table 3. As ionic strength increases, pK_a values decrease from 8.04 ± 0.1 to 7.38 ± 0.1 . Data were well fit by linear regression with an R^2 value of 0.96. Error bars in individual pK_a values are from data fitting, increased to a minimum of 0.1 to allow for potential systematic errors. The slope and y-intercept are -0.34 ± 0.04 and 7.38 ± 0.05 pK_a units, respectively. Experiments were conducted under standard conditions at 10 °C.

Для гемоглобина HbGp получена следующая зависимость нескомпенсированного заряда от pH (по данным о электрофоретической подвижности). Используя справочные данные (CRC, раздел 8), подобрать органические кислоты/основания, при помощи которых можно иммобилизовать HbGp на поверхности электростатически. В молекулы-линкерах должно быть не менее трех атомов углерода и концевая функциональная группа (иначе при их пришивке к поверхности может измениться их pK).

Table 1. Electrophoretic Mobility (μ_e) and the Number of Uncompensated Charges (N_c) for HbGp in Its Different forms

pH	μ_e ($\mu\text{m}\cdot\text{cm}/(\text{V s})$)	D_h (nm) ^a	N_c
Oxy-HbGp			
4.4	1.2 ± 0.2	27	17 ± 3
4.5	0.8 ± 0.2	27	12 ± 3
4.8	0.6 ± 0.2	27	9 ± 3
5.1	0.3 ± 0.2	27	4 ± 3
5.4	0.1 ± 0.2	27	1 ± 3
5.7	-0.1 ± 0.1	27	-2 ± 1
6.0	-0.3 ± 0.2	27	-4 ± 3
6.3	-0.4 ± 0.1	27	-5 ± 1
6.5	-0.5 ± 0.2	27	-7 ± 3